

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 食虫哺乳類由来神経毒ペプチドの生物有機化学的研究

氏 名 矢野 佑介

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は食虫哺乳類ブラリナトガリネズミの顎下腺由来の神経毒ペプチド *Blarina* Paralytic Peptides (BPPs) 1, 2 に関する研究について述べたものである。これまで研究されてきた動物毒は、爬虫類や海洋生物由来のものが多く、一方で哺乳類由来の毒はそもそも有毒とされる種が少ないことや、それらの種が調査困難な環境に生息しているといった理由から研究はあまり進展していない。哺乳類の中でもごく限られた種のみが毒を生産・保有する理由は分かっていないことに加えて、哺乳類由来の毒にはその種の生態に関わる特異な機能が備わっている可能性も予想されることから非常に魅力的な研究対象であると言える。そこで本研究では BPP 類の合成と生物活性評価を実施し、BPP 類の構造を決定するとともに新たな機能を見出すことを目的とした。

第 1 章では主に哺乳類由来の毒に関する過去の研究について述べた後、本研究で取り扱うブラリナトガリネズミ (*Blarina brevicauda*) と BPP 類について詳述した。トガリネズミは真無盲腸目に属する食虫動物であり、昆虫やミミズなどの無脊椎動物を主な餌とする。しかし北米に生息するブラリナトガリネズミは体長約 7~10 cm とトガリネズミの中では比較的大型の種であり、無脊椎動物だけでなくカエルやネズミなどの脊椎動物も襲って捕食する習性が知られている。過去の研究において、ブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物から脊椎動物に対する致死性プロテアーゼ毒 *blarina toxin* が単離されていたが、この動物が主な餌とする無脊椎動物に対する麻痺性神経毒については未解明であった。そこでブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物について分離精製が行われた結果、ミールワーム麻痺活性を示す分子量約 5.2 – 5.6 kDa の 2 種類のペプチド BPP 1, 2 が発見された。BPP 類の構造はそれぞれ 48, 53 アミノ酸残基からなり、分子内に 3 組のジスルフィド結合を含む一本鎖ペプチドであると決定された。しかし野生のトガリネズミから得られた BPP 類の量は少なく、ジスルフィド結合様式を含む立体構造の解析や詳細な生物活性評価はされていなかった。そこで著者は推定された

構造の BPP 類を化学合成し、その構造決定と生物活性試験を実施することとした。

第 2 章では、BPP2 の化学合成ならびに BPP 類のアミノ酸配列の訂正について述べた。BPP 類のアミノ酸配列は哺乳類において広く保存されているオピオイド前駆体タンパク質 proenkephalin の一部にあたる synenkephalin (SYN) と類似している。SYN は分子内に 3 組のジスルフィド結合を含み、その結合様式は Cys(I)–Cys(IV), Cys(II)–Cys(V), Cys(III)–Cys(VI) (Type-I 構造と呼ぶ) と過去に決定されている。一般にアミノ酸配列が類似しているペプチド同士はその高次構造も似ていると考えられるため、SYN と BPP 類のジスルフィド結合様式は同一であると予想し、まずは Type-I 構造の BPP2 を合成することとした。はじめに Fmoc 固相合成法および native chemical ligation (NCL) 法によりジスルフィド結合の対となる Cys 残基がそれぞれ Ac₂O 基と *t*Bu 基で保護された BPP2 の一本鎖ペプチドを得た。続いて保護基の除去とジスルフィド結合形成を段階的かつ選択的に行い Type-I 構造の BPP2 を合成した。しかしこの合成品 BPP2 の HPLC 保持時間や UV スペクトルの吸収パターンは天然品 BPP2 のものとは一致しなかった。このことから当初決定した BPP2 のアミノ酸配列やジスルフィド結合様式が誤っていることが示唆された。そこで、最近報告されたブラリナトガリネズミ顎下腺のトランスクリプトーム解析情報に基づいて BPP 類のアミノ酸配列を精査した。その結果、当初決定された BPP 類のアミノ酸配列における 3 残基の誤りを発見し、BPP1, 2 の全長アミノ酸配列をそれぞれ 47, 52 残基へと訂正するに至った。

第 3 章では、アミノ酸配列訂正後の BPP2 の合成とそのジスルフィド結合様式の解析について述べた。合成に先立ち、訂正したアミノ酸配列に基づいて BPP2 の立体構造を予測すべく ColabFold を使用した。その結果、これまで推定していた Type-I 構造とは異なる Cys(I)–Cys(V), Cys(II)–Cys(IV), Cys(III)–Cys(VI) という新たなジスルフィド結合様式 (Type-II 構造と呼ぶ) を持つものが最適な予測構造として得られた。以上の結果から Type-I 構造と Type-II 構造の両方の可能性を踏まえて BPP2 の合成を行った。全ての Cys 残基が無保護の状態の一本鎖ペプチドを Fmoc 固相合成法と NCL 法により合成し、酸化還元剤として cystine / cysteine を用いた酸化還元平衡条件下でフォールディングを行った結果、BPP2 がほぼ単一の生成物として得られた。この合成品の HPLC 保持時間と UV スペクトルの吸収パターンは天然品 BPP2 のものとよく一致した。なお合成品 BPP2 の CD スペクトルの波形は、上記の立体構造モデルから予想した波形とほぼ一致していた。次に、ジスルフィド結合様式を決定するため合成品 BPP2 を TCEP 処理で部分的に還元し、2 種類のアルキル化剤 (NEM, IAM) で段階的に *S*-アルキル化した。得られた複数の修飾ペプチドを HPLC で分離後、それぞれを酵素消化して得た断片ペプチドを MALDI MS/MS で網羅的に解析した。その結果、合成品 BPP2 のジスルフィド結合様式は Type-II 構造と判明し、天然品 BPP1, 2 のジスルフィド結合様式も Type-II 構造であると決定できた。

第 4 章では、合成品を用いた BPP2 の生物活性評価について述べた。合成品 BPP2 (5.6 µg / g body weight) をミールワームに腹腔内投与すると投与直後から数分で全身に麻痺が広がり、1.5 時間後には外部刺激に対する応答が見られなくなった。この麻痺

効果は 6 時間程度持続した。またホールセルパッチクランプ法を用いて BPP2 に対する Ca チャネルの応答評価を行った。その結果、BPP2 (0.84 μ M) はヒト T 型 Ca チャネル (hCa_v3.2) を活性化し、その活性化閾値を 11 mV 低下させることが分かった。これは膜電位の変化に対するチャネルの感度が高まっていることを意味する。一方で痛覚の伝達に参与するヒト N 型 Ca チャネル (hCa_v2.2) に対しては、BPP2 は顕著な効果を示さなかった。hCa_v3.2 を活性化してチャネルの感度を向上させる化合物はこれまでに報告がなく、今回見出した BPP2 の活性は新規性が高いと言える。さらに立体構造比較プログラム DALI を用いた解析から、BPP2 のジスルフィド結合様式と立体構造はムカデ由来の神経毒ペプチド scoloptoxin (SLPTX) 類と高い類似性を示すことも発見した。SLPTX 類は Na チャネルや K チャネルに対する特異的な阻害活性や、昆虫に対する致死活性を示す。また SLPTX 類は節足動物において広く保存されている無毒の内因性ペプチドと共通の起源を持つことが知られている。このことは互いにアミノ酸配列が類似している BPP 類と SYN にも当てはまる可能性がある。つまり BPP 類が SYN を起源とした分子進化を経て毒性を獲得したとすれば、イオンチャネルを標的とする点や類似の立体構造を持つ点で共通する BPP 類と SLPTX 類は、それぞれの種の生存戦略にとって有利に働くような進化が内因性ペプチドに起きた結果生み出されたと推察される。

以上より、本研究ではブラリナトガリネズミの顎下腺から単離された神経毒ペプチド BPP 類のアミノ酸配列とジスルフィド結合様式を決定し、さらに BPP2 の全合成を達成してその生物活性を明らかにした。希少な哺乳類由来の毒である BPP 類に関する本研究で得られた知見は、動物毒の多様性や生物進化における毒の関わりの観点からも高い意義があり、哺乳類毒に関する今後の研究の発展にも寄与すると期待される。